

سنجش نسبت بیان *HOXB13:IL17BR* در بیماران مبتلا به سرطان پستان به روش qRT-PCR با استفاده از رنگ سایبرگرین

الهام قاسم پور^۱، مجتبی عمادی بایگی^{۲*}، پروانه نیک پور^۳، آذر برادران^۴

گروه ژنتیک، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ گروه ژنتیک، پژوهشکده بیوتکنولوژی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ گروه ژنتیک، مرکز تحقیقات بیماری های ارثی کودکان، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران؛ گروه پاتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۴/۷/۱۳

تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۲/۵

چکیده:

زمینه و هدف: مطالعات نشان داده اند نسبت بیان *HOXB13:IL17BR* شاخص پیشگویی پیامدهای کلینیکی در بیماران مبتلا به سرطان پستان با تومورهای استروژن رسپتور مثبت و عدم درگیری غدد لنفاوی تحت درمان با تاموکسیفن است. تمام این آزمایشات با روش qReal Time RT-PCR با استفاده از پروب TaqMan انجام شدند. هدف پژوهش حاضر سنجش این نسبت با روش qReal Time RT-PCR با استفاده از سایبرگرین بود.

روش بررسی: در این مطالعه ی مورد- شاهده، نسبت بیان *HOXB13:IL17BR* در ۴۰ نمونه ی توموری و غیرتوموری پارافینه شده سرطان پستان مورد بررسی قرار گرفت. پس از استخراج RNA از بافت ها و سنتز cDNA و تکثیر توالی مورد نظر توسط واکنش زنجیره ای پلیمرز و به دست آوردن دمای بهینه برای هر ژن، جهت سنجش بیان از روش qReal Time RT-PCR استفاده شد و رنگ سایبرگرین I به عنوان نشانگر مورد استفاده قرار گرفت. سطح بیان ژن های هدف با استفاده از میانگین هندسی سطح بیان ژن های خانه داری توسط نرم افزار BestKeeper به دست آمد و نرمال سازی شد. مقایسه میانگین بیان ژن بین نمونه های توموری و غیرتوموری با استفاده از آزمون t-test انجام شد و مقایسه رابطه بین گروه ریسک بالا/پایین و دارا بودن/نبودن علائم بیماری با استفاده از آزمون Fisher's Exact test انجام شد.

یافته ها: میانگین نسبت بیان *HOXB13:IL17BR* در نمونه های توموری با نمونه های نرمال از نظر آماری تفاوت معنی داری نشان نداد. نتایج مطالعه نشان داد که بین قرار گرفتن یک فرد بیمار در ۲ گروه ریسک بالا و پایین (بر اساس میانگین نسبت بیان ژن *HOXB13:IL17BR*)، با عود بیماری در آینده ارتباط مستقیم و معنی داری وجود دارد.

نتیجه گیری: نتایج در مطالعه حاضر نشان داد، علی رغم جایگزینی رنگ سایبرگرین با پروب، همچنان بین نسبت بیان *HOXB13:IL17BR* و زندگی با علائم بیماری رابطه معنی داری وجود دارد.

واژه های کلیدی: سرطان پستان، ژن *HOXB13*، ژن *IL17BR*، qReal Time RT-PCR، سایبرگرین I.

مقدمه:

زودتر و در مراحل پیشرفته تر بروز می کند، به صورتی که میانگین سن تشخیص بیماری در زنان ایرانی ۴۵ سال و در زنان کشورهای غربی ۵۶ سال است (۲). در کل می توان سرطان پستان را به ۳ گروه اصلی: (۱) لومینال (۲) سه گانه منفی (۳) HER2+ تقسیم کرد (۳).

سرطان پستان شایع ترین و مهلک ترین سرطان شناخته شده در میان زنان در سطح جهان است، به صورتی که این سرطان ۲۳٪ از سرطان های موجود در زنان را در بر می گیرد (۱). سرطان پستان در زنان ایرانی در مقایسه با زنان کشورهای غربی، حداقل یک دهه

(۱) گروه لومینال: که سلول‌های توموری در این گروه از بیماران گیرنده استروژن- مثبت ($ER+$) هستند، این گروه به ۲ دسته تقسیم می‌شود: لومینال A: که در این دسته گیرنده پروژسترون (PR) نیز افزایش بیان داشته است، اما $HER2-$ هستند که در این دسته پیشرفت تومور به آرامی انجام می‌گیرد و پیش‌آگهی خوبی دارند. لومینال B: سلول‌های توموری در این دسته از بیماران از نوع $ER+$ ، $PR-$ ، $HER2+$ هستند که در برخی موارد سرعت پیشرفت تومور بیشتر از لومینال A می‌باشد.

(۲) سه گانه منفی: که در این دسته $ER-$ ، $PR-$ و $HER2-$ هستند، در این دسته از بیماران گیرنده استروژن و پروژسترون وجود ندارد و میزان بیان ژن $HER2$ نیز در حد نرمال می‌باشد.

(۳) $HER2+$: در این دسته از بیماران تعداد کمی از $HER2$ افزایش یافته است. به دلایل نامعلوم این نوع از سرطان پستان در زنان جوان بیشتر رواج دارد (۴).

هتروژن بودن سرطان پستان و ناتوانی در تشخیص دقیق نوع عملکردهای کلینیکی، باعث بغرنج شدن نحوه مدیریت کلینیکی این بیماری گشته است (۵، ۳). بر خلاف این که در گذشته سرطان پستان به عنوان یک بیماری شناخته شده در نظر گرفته می‌شد که از طریق یک مدل چند مرحله‌ای به وجود می‌آید، امروزه با تجزیه و تحلیل مولکولی مشخص شده است که سرطان پستان فوق العاده بیماری هتروژنی است (۶). تا چند سال گذشته، بهترین معیار تخمین خطر برای افراد مبتلا به این بیماری، پارامترهای کلینیکوپاتولوژی (شامل: وسعت درگیری غدد لنفاوی، سایز تومور، گرید هیستولوژیک تومور و وضعیت گیرنده‌های هورمونی) بوده است. تقریباً ۷۰٪ تا ۷۵٪ از تومورهای پستان از نوع $ER+$ می‌باشند. امروزه ER هنوز یکی از موثرترین اهداف برای درمان سرطان پستان محسوب می‌شود که افراد با $ER+$ بعد از تشخیص بیماری تحت درمان با آنتی استروژن‌ها و هورمون درمانی قرار می‌گیرند (۷). در این نوع از

سرطان پستان، هورمون درمانی خطر بازگشت بیماری و مرگ را در افراد کاهش می‌دهد (۸). تاموکسیفن یکی از داروهای رایجی است که در این گروه از بیماران مورد استفاده قرار می‌گیرد. این دارو یک تعدیل کننده‌ی انتخابی برای ریسپتور استروژن است که برای اتصال به این گیرنده با استروژن رقابت می‌کند. از آن جایی که برخی از این پارامترها در دسته بندی سرطان پستان و تعیین نوع رفتارهای کلینیکی و پیامد مطابق با آن‌ها با شکست مواجه شده‌اند و از سمت دیگر مطالعات متعددی نشان داده‌اند که نسبت بالای از بیمارانی که غدد لنفاوی آن‌ها درگیر نشده است (LNN) و تحت درمان با شیمی درمانی قرار گرفته‌اند، به دلیل نبود روش‌های دقیق برای انتخاب درمان مناسب، در معرض خطر عود بیماری هستند (۹). از این رو نیازی ضروری به تشخیص بیومارکرهای مولکولی جدید، جهت انتخاب مدیریت کلینیکی بهینه برای زنان مبتلا به سرطان پستان، به شدت احساس می‌شود (۵، ۱۰، ۱۱). طی مطالعات اخیر، بیومارکرهای جدید و پروفایل‌های ژنی جدیدی برای پیش بینی ریسک بازگشت بیماری و جوابدهی به هورمون درمانی در بیماران مبتلا به سرطان پستان معرفی شده‌اند. با شکل گیری نشانگرهای ژنتیکی معتبر برای این هدف، پیش بینی و تعیین نوع هورمون درمانی در مراحل ابتدایی بیماری ممکن می‌شود (۱۲). طی تحقیقات انجام شده ثابت شده است که نسبت بیان *HOXB13:IL17BR* می‌تواند به عنوان یک بیومارکر جدید در مراحل اولیه‌ی بیماری، برای پیشگویی پیامدهای سرطان در بیمارانی از نوع $ER+$ و LNN در نظر گرفته شود (۱۳، ۱۴). طی تحقیقات به عمل آمده بیمارانی که این نسبت در آن‌ها بالا باشد، دوران زندگی تا بازگشت بیماری (RFS)، زنده ماندن بیمار (OS) و زنده ماندن بدون علائم بیماری (DFS) در آن‌ها در مقایسه با بیمارانی که این نسبت در آنان کم است، کوتاه تر بوده است (۱۷-۱۵)؛ همچنین بالا بودن این نسبت در بیماران، مقاومت به درمان با

جدول شماره ۱: ویژگی‌های کلینیکی و پاتولوژیکی نمونه‌های توموری مورد مطالعه

ویژگی‌ها	فراوانی
سن	۵۰≥ ۱۰
	≤۵۰ ۱۰
نوع بافت	توموری ۲۰
	نرمال ۲۰
نوع هیستوپاتولوژیکی تومور	IDC ۱۸
	ILC ۲
مرحله بندی TNM	مرحله I ۵
	مرحله II ۱۵
درجه تومور	درجه I ۵
	درجه II ۱۴
	درجه III ۱
سایز تومور	T<۲ ۵
	۲<T<۵ ۱۴
	T>۵ ۱

نمونه‌های توموری مذکور از سال‌های ۸۸ تا ۹۲ در بیمارستان الزهرا اصفهان به صورت پارافینه شده، نگهداری شده بودند. برای انجام این پژوهش از این تومورها برش‌های ۳۰ میکرومتری تهیه شد و تا مرحله‌ی استخراج RNA در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. اطلاعات بالینی لازم از مطالعه‌ی پرونده بیماران پس از کسب رضایت از ایشان به‌دست آمد. RNA تمامی نمونه‌های جمع‌آوری شده با استفاده از کیت کیاژن (با شماره کاتالوگ ۷۳۵۰۴) استخراج شد؛ سپس با استفاده از کیت تاکارا (با شماره کاتالوگ RR037A) مولکول‌های RNA استخراج شده از بافت‌های پارافینه به عنوان الگو برای سنتز cDNA مورد استفاده قرار گرفت. در این پژوهش ۳ ژن خانه‌داری به عنوان ژن‌های کنترل داخلی در نظر گرفته شد. پرایمرهای طراحی شده برای هر ۵ ژن در جدول شماره ۲ آورده شده است.

تاموکسیفن را به همراه خواهد داشت (۱۹،۱۸،۱۴). در طرفی در بین انواع سرطان پستان، نوع ER+ درصد بالایی را به خود اختصاص می‌دهد، طی دو مطالعه‌ی جداگانه نشان داده شده است که ۵۷٪ و ۶۲/۳٪ از زنان تهرانی مبتلا به سرطان پستان، از نوع ER+ می‌باشند (۲۱،۲۰). از آن جایی که این تست مربوط به گروه ER+ می‌باشد، می‌تواند قدم مثبتی در انتخاب عملکرد کلینیکی بهینه برای درصد اعظمی از بیماران مبتلا به سرطان پستان از این گروه باشد. مهم‌تر این‌که انجام این تست در ایران تا به امروز به مرحله‌ی اجرا نرسیده است؛ بنابراین نیاز به انجام این تست احساس می‌شود (۲۲). در تمامی تحقیقات پیشین برای سنجش نسبت بیان *HOXB13:IL17BR* از روش qReal-Time PCR استفاده شده است و در تمامی آن‌ها پروب TaqMan به عنوان نشانگر مورد استفاده قرار گرفته است. در این پژوهش نیز نسبت بیان *HOXB13:IL17BR* در ۲۰ بیمار مبتلا به سرطان پستان مورد بررسی قرار گرفت، اما بر خلاف تمامی مطالعات قبلی، در پژوهش حاضر برای سنجش نسبت بیان *HOXB13:IL17BR* در نمونه‌ها، از رنگ سایبرگرین I به عنوان نشانگر استفاده شد و نتایج حاصل از سایبرگرین با نتایج حاصل از مطالعات قبلی که از پروب TaqMan استفاده شده بود، مورد مقایسه قرار گرفت.

روش بررسی:

در پژوهش حاضر که از نوع مورد-شاهدی است، ۴۰ نمونه به صورت جفت، شامل ۲۰ نمونه بافت توموری و ۲۰ نمونه بافت نرمال که از بافت غیرتوموری و سالم اطراف تومور برداشته شده بود، مورد بررسی قرار گرفت. مشخصات کلینیکوپاتولوژیکی نمونه‌های مورد استفاده در این تحقیق در جدول شماره ۱ آورده شده‌اند.

جدول شماره ۲: توالی پرایمرهای طراحی شده جهت استفاده در پژوهش

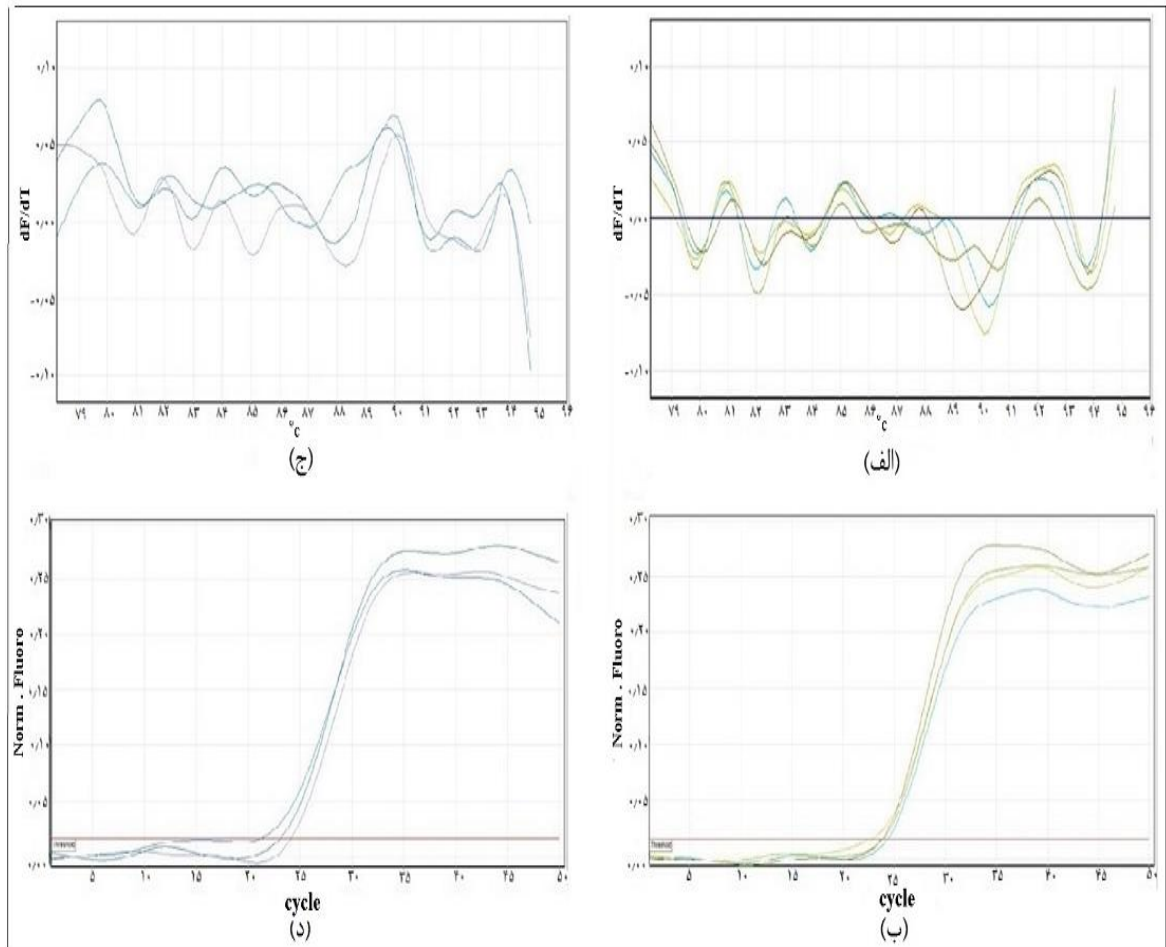
نام ژن	طول آمپلیکون (bp)	Reverse	Forward
<i>HOXB13</i>	۲۳۸	AGTCATGTCGCGGTTCTCC	CACTGAGTTTGCCTTCTATCCG
<i>IL17BR</i>	۱۲۶	TCTTCTGGTGTGGCTCAAAC	GTAAGAAGAATGAGGAGACAGTA
<i>ACTB</i>	۱۴۷	AGGTCTCAAACATGATCTGGGT	G ACTGGGACGACATGGAGAA
<i>UBC</i>	۱۲۷	CGAAGATCTGCATTGTCAAGTG	GGTGAACGCCGATGATTATA
<i>HMBS</i>	۱۲۷	TCATCCTCAGGGCCATCTTC	CTATGAAGGATGGGCAACTGTAC

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر حاوی ۱۷/۸ آب عاری از نوکلئاز، ۰/۵ میکرولیتر dNTP، ۲ میکرولیتر cDNA، ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰X، ۱ میکرولیتر $MgCl_2$ ، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase و ۰/۵ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرها در دستگاه ترموسایکلر به انجام رسید. بعد از بهینه سازی دما در واکنش PCR صحت محصولات با استفاده از ژل آگارز ۱٪ مورد تأیید قرار گرفت. دماهای بهینه‌ی به دست آمده در واکنش‌های PCR برای انجام واکنش‌های Real Time RT-PCR مورد استفاده قرار گرفت. واکنش‌های Real Time RT-PCR با استفاده از رنگ فلورسنت SYBR Green I و با حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر حاوی ۳/۸ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز، ۵ میکرولیتر سایبرگرین I و ۰/۱ از هر کدام از پرایمرها در دستگاه Rotor-Gene 6000 (کیاژن) انجام شد. با استفاده از برنامه BestKeeper، شاخص وزنی بیان برای ۳ ژن خانه داری (*ACTB*، *HMBS*، *UBC*) به دست آمد و با استفاده از روش Livak یا $\Delta\Delta C_T$ داده‌ها نرمال سازی شدند و نسبت بیان ۲ ژن

HOXB13:IL17BR در نمونه های توموری و نرمال هر فرد محاسبه شد. پیش بینی پیک منحنی ذوب در مورد ژن *HOXB13* با استفاده از نرم افزار uMelt انجام شد. با استفاده از نرم افزار SPSS مقایسه میانگین بیان ژن بین نمونه های توموری و غیرتوموری با استفاده از آزمون t-test انجام شد. مقایسه رابطه متغیرهای کیفی ۲ حالت (گروه ریسک بالا/ پایین و دارا بودن/ نبودن علائم بیماری) با استفاده از آزمون Fisher's Exact test انجام شد.

یافته ها:

منحنی ذوب و منحنی تکثیر حاصل از qReal Time PCR با استفاده از سایبرگرین برای همه‌ی نمونه‌ها و برای هر ۵ ژن مورد مطالعه به دست آمد. در واکنش Real-Time PCR برای ژن *HOXB13*، برای تعدادی از بیماران پیک اصلی در دمای ۹۰-۹۱ درجه سانتی‌گراد و برای تعدادی دیگر پیک اصلی در دمای ۹۲ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد (تصویر شماره ۱). نرم افزار uMelt دمای تشکیل پیک در نمودار ذوب را ۹۲ درجه سانتی‌گراد پیش بینی نمود.



تصویر شماره ۱: منحنی ذوب (الف و ج) و منحنی تکثیر (ب و د)، مربوط به تشکیل پیک در دمای ۹۲ (الف و ب) و در دمای ۹۱-۹۰ درجه سانتی گراد (ج و د)، در واکنش‌های Real Time RT-PCR برای رونوشت *HOXB13*.

کلینیکوپاتولوژیکی مانند مرحله و درجه تومور رابطه‌ای مشاهده نگردید. از بین ۲۰ بیمار مورد مطالعه، اطلاعات مربوط به تعداد سال "دوران زندگی تا بازگشت بیماری" و "زنده ماندن بدون علائم بیماری" مربوط به ۱۵ بیمار قابل دستیابی بود. از بین این ۱۵ بیمار طبق عدد مرزی (۰/۰۶) توسط Ma و همکاران، ۱۳ بیمار در دسته ریسک بالا و ۲ بیمار در دسته ریسک پایین دسته بندی شدند (۲۳). اطلاعات نشان می داد از بین ۱۳ نفری که جزء دسته ریسک بالا دسته بندی شدند، در فاصله زمانی ۲-۶ سال بعد از شروع درمان، ۱۱ نفر علائم بیماری را نشان داده بودند و از ۲ نفری که در دسته ریسک پایین دسته بندی شدند، ۱ نفر علائم بیماری را نشان داده بود (در واقع تعداد سال "زنده ماندن بدون علائم بیماری"). درخصوص شاخص "دوران زندگی تا بازگشت

در این مطالعه به کمک نرم افزار BestKeeper، شاخص وزنی بیان برای هر بیمار، برای هر ۳ ژن خانه داری ذکر شده (*UBC* و *HMBS*، *ACTB*) به دست آمد؛ سپس داده‌های خام (C_T) حاصل از انجام واکنش‌های Real Time-PCR، با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta C_t}$ در ۲۰ جفت نمونه‌ی توموری و نرمال مذکور، نسبت به شاخص وزنی حاصل از BestKeeper و نمونه‌ی کالیبراتور نرمال سازی شد و تغییر نسبت بیان *IL17BR:HOXB13* در این نمونه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. اگرچه میانگین میزان نسبت بیان *HOXB13:IL17BR* در نمونه‌های توموری بیشتر از میانگین این نسبت در نمونه‌های نرمال بود، با این حال این تفاوت از نظر آماری معنی دار نبود ($P>0/05$). بین نسبت بیان *HOXB13:IL17BR* با پارامترهای

بیماری"، از بین ۱۳ نفر دسته ریسک بالا، ۱ نفر عود بیماری و فوت بر اثر بیماری را نشان داده بود. آنالیز آماری درخصوص بررسی ارتباط بین دسته بندی بیماران به ۲ گروه "ریسک بالا" و "ریسک پایین" و نشان دادن علائم بیماری در جدول شماره ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان داد، بین داده های مشاهده شده و مورد انتظار تفاوت معنی داری مشاهده نمی شود ($P=0/371$). در واقع قرار گرفتن یک فرد بیمار در ۲ گروه ریسک بالا و پایین (براساس میانگین نسبت بیان ۲ ژن *HOXB13:IL17BR* داده مشاهده شده است)، با وضعیت عود بیماری در آینده (داده مورد انتظار) ارتباط مستقیم و معنی داری دارد.

جدول شماره ۳: ارتباط بین دسته بندی بیماران به ۲ گروه "ریسک بالا" و "ریسک پایین" و نشان دادن علائم بیماری

دسته بندی بیماران	وضعیت عود بیماری		جمع کل	P
	نداشته	داشته		
ریسک بالا	۱۱	۲	۱۳	۰/۳۷۱
ریسک پایین	۱	۱	۲	
جمع کل	۱۲	۳	۱۵	

بحث:

نتایج مطالعه حاضر، مانند مطالعات قبلی رابطه ی بین نسبت بیان ۲ ژن *HOXB13:IL17BR* با وضعیت عود بیماری در آینده را نشان داد؛ به صورتی که افرادی که با توجه به عدد مرزی در دسته ریسک بالا قرار می گرفتند، بیشتر در معرض نشان دادن علائم بیماری در طی زندگی شان قرار داشتند و مانند نتایج حاصل از مطالعات قبلی در این پژوهش نیز بین نسبت بیان *HOXB13:IL17BR* با پارامترهای کلینیکی پاتولوژیکی مانند مرحله و درجه تومور رابطه ای مشاهده نشد (۵، ۱۹، ۲۳). مطالعات ثابت کردند با به دست آوردن نسبت *HOXB13:IL17BR* در تومورها، می توان بیماران را در ۲ دسته ی ریسک بالا و ریسک پایین تقسیم بندی

کرد و با توجه به این دسته بندی می توان مدیریت کلینیکی بهینه را برای بیماران مبتلا به سرطان از نوع ER+ انتخاب کرد (۱۷، ۱۴). این نسبت ژنی به عنوان یک بیومارکر مولکولی جهت پیش بینی پیامدهای کلینیکی در این دسته از بیماران مبتلا به سرطان پستان مورد تأیید است (۲۳، ۵). در تمامی تحقیقات پیشین برای سنجش نسبت بیان *HOXB13:IL17BR* از روش Real-Time PCR استفاده شده است و در تمامی آن ها پروب TaqMan به عنوان نشانگر مورد استفاده قرار گرفته است. در این پژوهش نیز نسبت بیان *HOXB13:IL17BR* در ۲۰ بیمار مبتلا به سرطان پستان از نوع ER+ و LNN مورد بررسی قرار گرفت، اما برخلاف تمامی مطالعات قبلی، در پژوهش حاضر برای سنجش نسبت بیان *HOXB13:IL17BR* در نمونه ها از رنگ سایبرگرین I به دلیل ارزان تر بودن به عنوان نشانگر استفاده شد. در این مطالعه مانند دیگر مطالعات، با توجه به اطلاعات کسب شده از ۱۵ بیمار، بین نسبت بیان ژن *HOXB13:IL17BR* و وجود علائم بیماری رابطه مشاهده شد. به صورتی که در افرادی با نسبت بیان بالای *HOXB13:IL17BR* احتمال وجود علائم بیماری بیشتر بود.

همان طور که در بخش نتایج ذکر شد، در مورد ژن *HOXB13* برای تعدادی از بیماران پیک اصلی در دمای ۹۲ درجه سانتی گراد و برای تعدادی دیگر پیک اصلی در دمای ۹۱-۹۰ درجه سانتی گراد مشاهده شد؛ اما در مطالعات قبلی ذکر ی از وجود ۲ پیک اصلی در منحنی ذوب ژن *HOXB13* به میان نیامده است. طبق پیش بینی نرم افزاری، پیک آمپلیکون مورد نظر در دمای ۹۲ درجه سانتی گراد شکل می گیرد. با استفاده از سایت NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/snp)، پلی مورفیسم های تک نقطه ای (SNP) موجود در آمپلیکون ۲۳۸ نوکلئوتیدی از ژن *HOXB13* به دست آمد. ۴۰ SNP در این آمپلیکون وجود دارد که با استفاده از برنامه uMelt مشخص شد که از بین این

SNPها وقوع هر یک از ۳ SNP:rs377339084، rs777986934 و rs748353425 باعث می‌شود، تشکیل پیک به سمت دمای ۹۰-۹۱ درجه سانتی‌گراد متمایل شود و ممکن است در مورد نمونه‌هایی که پیک آن‌ها در دمای ۹۰-۹۱ درجه سانتی‌گراد شکل گرفته یکی از این ۳ SNP رخ داده باشد. از طرفی، با توجه به منحنی‌های ذوب مربوط به ژن *HOXB13*، می‌توان متوجه شد که علاوه بر پیک اصلی چند پیک دیگر وجود دارد. هر چند که بر روی ژل فقط یک باند قابل مشاهده بود و طبق برنامه uMelt فقط یک پیک در دمای ۹۲ درجه سانتی‌گراد باید شکل بگیرد. حضور دیگر پیک‌ها به چند مرحله‌ای بودن ذوب DNA برمی‌گردد، در مورد این فرضیه که ذوب DNA طی ۲ مرحله‌ی دو رشته‌ای و تک رشته‌ای انجام می‌شود، باید تجدید نظر کرد. چرا که ممکن است در آمپلیکون نقاط پایدارتری وجود داشته باشد (نقاطی که غنی از G و C هستند) که همراه دیگر نقاط DNA ذوب نمی‌شود و تا زمانی که دمای مناسب برای ذوب فراهم شود، دو رشته‌ای باقی می‌ماند که این حالت باعث می‌شود، در منحنی ذوب بیش از یک پیک مشاهده شود؛ از طرفی فاکتورهای مربوط به خود توالی، مانند انحرافات در نواحی غنی از AT و تشکیل ساختار ثانویه در خود آمپلیکون نیز می‌توانند باعث ذوب در مراحل مختلف شود؛ لذا در مجموع ۳ احتمال وجود دارد: اول این که با توجه به ۲۳۸ نوکلئوتیدی بودن آمپلیکون احتمال وقوع SNP بیشتر است؛ وقوع این SNPها باعث می‌شود تا پیک اصلی در منحنی ذوب در دماهای متفاوت تشکیل شود؛ دوم این که با توجه به طول آمپلیکون احتمال وجود ناهمگونی در پایداری و درصد G و C در نقاط مختلف آمپلیکون بیشتر است و سوم این که طول آمپلیکون ممکن است احتمال وقوع ساختار ثانویه در داخل آمپلیکون را افزایش می‌دهد. از آنجایی که در استفاده از پروب‌ها آمپلیکون مورد نظر طراحی شده کوچک است و اغلب زیر ۱۰۰ نوکلئوتید می‌باشد. وقوع این احتمالات به شدت کاهش می‌یابد، اما در حالتی که از سایبرگرین به‌عنوان نشانگر استفاده می‌کنیم

طول آمپلیکون باید بالای ۱۰۰ نوکلئوتید باشد، چرا که با استفاده از رنگ‌ها قادر به تشخیص پرایمر دایمر از محصول اصلی نخواهیم بود. پروب‌ها براساس تشخیص اختصاصی توالی محصول کار می‌کنند و یکی از مزیت‌های پروب‌ها نسبت به تمامی رنگ‌های متصل شونده به DNA این است که تولید سیگنال‌های فلورسنت نیاز به جفت شدن کاملاً اختصاصی پروب با توالی هدف دارد که این موضوع باعث می‌شود تا پرایمر دایمر یا باند غیراختصاصی سیگنالی تولید نکنند و دقت عمل در پروب TaqMan بالاتر رود. غیراختصاصی بودن سایبرگرین در عین حال که بزرگ‌ترین مزیت برای این رنگ به حساب می‌آید، مهم‌ترین عیب آن نیز به شمار می‌رود، چرا که نمی‌توان وجود محصولات غیراختصاصی یا پرایمر دایمر را به کمک این رنگ شناسایی کرد.

نتیجه گیری:

به طور خلاصه نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که علی‌رغم جایگزینی رنگ سایبرگرین با پروب، همچنان بین نسبت بیان *HOXB13:IL17BR* و زندگی با علائم بیماری رابطه معنی‌داری وجود دارد؛ به طوری که در افرادی که نسبت بیان این ۲ ژن بالا بود، احتمال وجود علائم بیماری در دوران زندگی نیز بیشتر بود.

تشکر و قدردانی:

در پایان از کلیه‌ی بیماران محترم، پرسنل بیمارستان الزهراء اصفهان به‌خاطر یاری ایشان در جمع‌آوری نمونه‌ها و کلیه‌ی افرادی که ما را در انجام این پژوهش یاری رساندند، تشکر و قدردانی می‌گردد. این مقاله حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد خانم الهام قاسم پور با کد پایان‌نامه: ۱۶۱/۳۴۱ مصوب شده در تاریخ ۱۳۹۴/۷/۲۰ در دانشگاه شهرکرد، دانشکده علوم پایه، رشته ژنتیک می‌باشد که با حمایت مالی این دانشگاه به انجام رسیده است.

منابع:

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011; 61(2): 69-90.
2. Harirchi I, Ebrahimi M, Zamani N, Jarvandi S, Montazeri A. Breast cancer in Iran: A review of 903 case records. *Public Health*. 2000; 114(2): 143-5.
3. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000; 406(6797): 747-52.
4. WWW.cancer.org.2013; 21: 9.
5. Sgroi DC. The *HOXB13:IL17BR* gene-expression ratio: A biomarker providing information above and beyond tumor grade. *Biomark Med*. 2009; 3(2): 99-102.
6. Simpson PT, Reis-Filho JS, Gale T, Lakhani SR. Molecular evolution of breast cancer. *J Pathol*. 2005; 205(2): 248-54.
7. Massarweh S, Schiff R. Unraveling the mechanisms of endocrine resistance in breast cancer: New therapeutic opportunities. *Clin Cancer Res*. 2007; 13(7): 1950-4.
8. Goetz MP, Suman VJ, Ingle JN, Nibbe AM, Visscher DW, Reynolds CA, et al. A two-gene expression ratio of homeobox 13 and interleukin-17B receptor for prediction of recurrence and survival in women receiving adjuvant tamoxifen. *Clin Cancer Res*. 2006; 12(7 Pt 1): 2080-7.
9. Wang Y, Klijn JG, Zhang Y, Sieuwerts AM, Look MP, Yang F, et al. Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. *Lancet*. 2005; 365(9460): 671-9.
10. Weigelt B, Baehner FL, Reis-Filho JS. The contribution of gene expression profiling to breast cancer classification, prognostication and prediction: a retrospective of the last decade. *J Pathol*. 2010; 220(2): 263-80.
11. Microarray-based gene expression profiling as a clinical tool for breast cancer management: Are we there yet? *Int J Surg Pathol*. 2009; 17(4): 285-302.
12. Nicholson RI, McClelland RA, Gee JM, Manning DL, Cannon P, Robertson JF, et al. Epidermal growth factor receptor expression in breast cancer: Association with response to endocrine therapy. *Breast Cancer Res Treat*. 1994; 29(1): 117-25.
13. Sgroi DC, Haber DA, Ryan PD, Ma XJ, Erlander MG. RE: A two-gene expression ratio predicts clinical outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen. *Cancer Cell*. 2004; 6(5): 445-8.
14. Jansen MP, Sieuwerts AM, Look MP, Ritstier K, Meijer-van Gelder ME, Van Staveren IL, et al. *HOXB13:IL17BR* expression ratio is related with tumor aggressiveness and response to tamoxifen of recurrent breast cancer: A retrospective study. *J Clin Oncol*. 2007; 25(6): 662-8.
15. Jansen MP, Sieuwerts AM, Look MP, Ritstier K, Meijer-van Gelder ME, Van Staveren IL, et al. *HOXB13:IL17BR* expression ratio is related with tumor aggressiveness and response to tamoxifen of recurrent breast cancer: a retrospective study. *J Clin Oncol*. 2007; 25(6): 662-8.
16. Goetz MP, Suman VJ, Ingle JN, Nibbe AM, Visscher DW, Reynolds CA, et al. A two-gene expression ratio of homeobox 13 and interleukin-17B receptor for prediction of recurrence and survival in women receiving adjuvant tamoxifen. *Clin Cancer Res*. 2006; 12(7): 2080-7.
17. Ma X-J, Hilsenbeck SG, Wang W, Ding L, Sgroi DC, Bender RA, et al. The *HOXB13:IL17BR* expression index is a prognostic factor in early-stage breast cancer. *J Clin Oncol*. 2006; 24(28): 4611-9.
18. Ma XJ, Wang Z, Ryan PD, Isakoff SJ, Barmettler A, Fuller A, et al. A two-gene expression ratio predicts clinical outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen. *Cancer Cell*. 2004; 5(6): 607-16.

19. Jerevall PL, Brommesson S, Strand C, Gruvberger-Saal S, Malmstrom P, Nordenskjold B, et al. Exploring the two-gene ratio in breast cancer--independent roles for *HOXB13* and *IL17BR* in prediction of clinical outcome. *Breast Cancer Res Treat*. 2008; 107(2): 225-34.
20. Fallahazad V KN, Gransar A. The prevalence of Estrogen and progesteron receptors in Breast cancer in Shariati gen-eral hospital of Tehran 2000-2002. *J Tehran Med Faculty*. 2004; 25(2): 745-8.
21. Vahdani MA. Survival rate of breast cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2004; 17(6): 223-5.
22. Chu KC, Tarone RE, Kessler LG, Ries LA, Hankey BF, Miller BA, et al. Recent trends in U.S. breast cancer incidence, survival, and mortality rates. *J Natl Cancer Inst*. 1996; 88(21): 1571-9.
23. Ma XJ, Hilsenbeck SG, Wang W, Ding L, Sgroi DC, Bender RA, et al. The *HOXB13:IL17BR* expression index is a prognostic factor in early-stage breast cancer. *J Clin Oncol*. 2006; 24(28): 4611-9.

Evaluation of expression ratio of *HOXB13:IL17BR* in patients with breast cancer by qRT-PCR method using SYBR Green dye

Ghasempour E¹, Emadi Baygi M^{2*}, Nikpour P³, Baradaran A⁴

¹Genetics Dept., University of Shahrekord, Shahrekord, I.R. Iran; ²Genetics Dept., Biotechnology Institute, University of Shahrekord, Shahrekord, I.R. Iran; ³Genetics Dept., Pediatric Inherited Diseases Research Center, University of Isfahan, Isfahan, I.R. Iran;

⁴Pathology Dept., Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, I.R. Iran.

Received: 5/Oct/2015 Accepted: 24/Feb/2016

Background and aims: Studies have shown that a *HOXB13:IL17BR* expression ratio index predicts clinical outcome in ER-positive, lymph node-negative breast cancer patients that treated with adjuvant tamoxifen. All of these experiments were conducted with qReal Time RT-PCR using TaqMan probes. The aim of this study was to determine the ratio using SYBR Green I qReal Time RT-PCR.

Methods: In this case- control study, expression levels of *HOXB13:IL17BR* was measured in 40 paired formalin-fixed, paraffin-embedded primary breast tumor specimens. After extracting RNA from the tissues, cDNA synthesis and amplification with the polymerase chain reaction to obtain the optimum annealing temperature, the expression levels was measured by SYBR Green I qReal Time RT-PCR. To determine and normalize the expression levels, BestKeeper software was used to obtain the BestKeeper Index using the geometric mean of expression levels of housekeeping genes. Comparison of mean expression of genes between tumoral and non-tumoral tissues was performed by t-test and association between patient grouping (high/low risk) and time for disease free survival was assessed by Fisher's Exact test.

Results: *HOXB13:IL17BR* expression value did not show significant difference between tumoral and non-tumoral tissues. The results showed that there was a direct and significant association between patient grouping (based on *HOXB13:IL17BR* ratio) and disease free survival status.

Conclusion: Results in the current study showed that in spite of using SYBR Green dye (instead of TaqMan probes), there is still a significant correlation between *HOXB13:IL17BR* ratio and disease free survival status.

Keywords: Breast Cancer, *HOXB13*, *IL17BR*, qReal Time RT-PCR, SYBR Green I.

Cite this article as: Ghasempour E, Emadi Baygi M, Nikpour P, Baradaran A. Evaluation of expression ratio of *HOXB13:IL17BR* in patients with breast cancer by qRT-PCR method using SYBR Green dye. J Shahrekord Univ Med Sci. 2016; 18(5): 63-72.

***Corresponding author:**

Genetics Dept., Biotechnology Institute, University of Shahrekord, Shahrekord, I.R. Iran.
Tel: 00989124799801, E-mail: emadi-m@sci.sku.ac.ir